



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 195 12 369 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁸:
C 07 H 1/06
G 01 N 1/28

②1 Aktenzeichen: 195 12 369.7
②2 Anmeldetag: 1. 4. 95
④3 Offenlegungstag: 2. 10. 96

DE 195 12 369 A 1

⑦1 Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

⑦2 Erfinder:
Walter, Thomas, Dipl.-Chem. Dr., 83673 Bichl, DE;
Fritz, Michael, 68647 Biblis, DE; Harttig, Herbert,
Dipl.-Chem. Dr., 67122 Altrip, DE; Lange,
Hans-Rudolf, 68623 Lampertheim, DE; Lerch, Rolf,
68549 Ilvesheim, DE

⑤4 Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren

⑤7 Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer flüssigen Probe durch Einbringung der Flüssigkeit in die Vorrichtung durch eine Eintrittsöffnung und Durchtritt der Probe durch ein nukleinsäurebindendes Material und Austritt der resultierenden Flüssigkeit durch eine Austrittsöffnung, wobei das nukleinsäurebindende Material bei der Herstellung der Vorrichtung durch die Austrittsöffnung eingebracht wurde und die Austrittsöffnung zum Festhalten des Materials verengt wurde. Die Vorrichtung ist besonders einfach und sicher herstellbar und gewährleistet dennoch eine kontaminationsfreiere Isolierung von Nukleinsäuren.

BEST AVAILABLE COPY

DE 195 12 369 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 08. 96 602 040/555

10/25

Beschreibung

Gegenstand der Erfindung ist eine Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren, ein Verfahren zur Herstellung dieser Vorrichtung und zur Isolierung von Nukleinsäuren mit Hilfe dieser Vorrichtung.

In jüngerer Zeit haben sich Nukleinsäuren als Analyten in chemischen Nachweisverfahren immer weiter durchgesetzt, da sie eine sehr spezifische Diagnose von Krankheiten erlauben. So ist beispielsweise der Nachweis von viralen oder bakteriellen Infektionen oder die Bestimmung einer genetischen Disposition für eine Krankheit durch die Analyse von Nukleinsäuresequenzen sehr differenziert möglich. Dies wurde unter anderem durch die Einführung der Amplifikationsverfahren von Nukleinsäuren ermöglicht. Dennoch sind die zur Verfügung stehenden Mengen an Nukleinsäuren in einer Probe recht gering im Vergleich zu weiteren Komponenten der Probenflüssigkeiten. Viele dieser Komponenten können auch die Bestimmung von Nukleinsäuren stören. Aus diesem Grund hat es sich als zweckmäßig erwiesen, die Nukleinsäuren vor der Durchführung des eigentlichen Nachweisverfahrens von dem Großteil der in einer Probe enthaltenen Komponenten abzutrennen.

Schon früh wurde hierfür die Adsorption von Nukleinsäuren an feste Phasen vorgeschlagen. So wurde beispielsweise in Proc. Natl. Sci. U.S.A. 76, 615—619 (1979) die Eigenschaft von Nukleinsäuren in Gegenwart chaotroper Salze an Glasoberflächen zu binden, beschrieben. Hier wurde gemahlenes Flintglas für die Isolierung von Nukleinsäurefragmenten aus Agarose Gelen in Kombination mit einer gesättigten Lösung von NaI zur Auflösung der Agarose-Matrix verwendet. Hierbei wurden mehr als 95% der Nukleinsäuren nach 2 Stunden bei 25°C gebunden, wobei ca. 1 µg DNA/mg Glaspartikel gebunden wurden. Anschließend wurden die Glaspartikel mehrmals gewaschen und anschließend die Nukleinsäuren eluiert. Es ergab sich für diese Schritte ein Zeitbedarf von mindestens 3 Stunden.

Zur Verbesserung der Handhabung und Verkürzung des Zeitbedarfs wurden alternative Methoden zur Reinigung von Nukleinsäuren in Glasoberflächen entwickelt. WO 91/07648 beschreibt ein zylindrisches Kunststoffgefäß, das am Boden eine Kunststoffmembran enthält, die auch Glasfasern enthalten kann. Auch hier sind mehrere Wasch- und Elutionsschritte erforderlich. Ein ähnliches Verfahren ist auch in DE-A-41 27 276 beschrieben, wobei die nukleinsäurehaltigen Lösungen nur kurze Zeit mit der Glasoberfläche in Kontakt stehen. Entsprechende Produkte sind über die genannten Patentanmelder erhältlich. Im ersten Fall wird als Bindungskapazität 50 ng bis 30 µg in einer Größenverteilung von 100 bis 23 000 bp angegeben. Die Ausbeute wird mit 60 bis 85% beziffert. Um die maximale Effizienz zu erreichen, wird vom Hersteller empfohlen, den Durchlauf der Probe mindestens auf zweimal aufzutragen, da sonst die Ausbeute um mindestens 25% reduziert ist. Für Fragmente mit einer Größe von mehr als 23 000 bp beträgt die Ausbeute höchstens 40%.

Die angebotenen Zentrifugationsröhrchen enthalten je nach erforderlicher Bindungskapazität mehrere Lagen Glasfaservlies in einem Gefäß mit stark konischem Boden. Mittig im Boden befindet sich eine kleine Auslauföffnung. Die Herstellung der Zentrifugationsröhrchen geschieht so, daß zunächst das Glasfaservlies von oben in das Gefäß eingeführt und auf den Boden gedrückt wird. Anschließend wird durch die gleiche Öffnung, durch die später die Nukleinsäurelösung aufgegeben wird, ein Ring in das Gefäß eingeführt, der durch Kontakt mit der Innenwand des Gefäßes das Glasfaservlies am Boden festdrückt und somit ein Aufschwimmen des Vlieses während der Inkubation mit der nukleinsäurehaltigen Probe verhindert. Diese Art der Konstruktion des Zentrifugationsröhrchens hat, wie nun festgestellt wurde, den Nachteil, daß viele störende Probenkomponenten in ihr zurückgehalten werden, so daß mehrere Waschschritte zur vollständigen Entfernung erforderlich werden. Dies wiederum führt zu einer verringerten Ausbeute an Nukleinsäuren oder zur Störung nachfolgender enzymatischer Reaktionen. Für ein auf dem Markt erhältliches Produkt wird eine Bindekapazität von 5 µg bei 90% Ausbeute mit einem 100 bp langen Fragment angegeben. In einem weiteren Produkt wird eine Ausbeute von 75 bis 90% bei einer Bindekapazität von 20 µg erreicht werden.

In dem bisher genannten Stand der Technik wird nur die Isolierung von DNA, nicht jedoch die Isolierung von Gesamt-Nukleinsäuren oder RNA beschrieben.

Gegenstand der Erfindung war daher die Verbesserung der Produkte zur Isolierung von Nukleinsäuren sowie deren Herstellung.

Diese Aufgabe wird gelöst durch eine Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer flüssigen Probe mit einer Eintritts- und einer Austrittsöffnung und einem zwischen diesen Öffnungen gelegenen Material zur Bindung der Nukleinsäuren, wobei die Austrittsöffnung nach Einbringen des Materials verengt wurde. Das erfindungsgemäße Gefäß kann fast jede beliebige äußere Form aufweisen. Bevorzugt hat sie jedoch eine im wesentlichen zylindrische oder auch zumindest in Teilen konische Form. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform dieses Gefäßes hat die Form einer Röhre, z. B. eines gängigen Zentrifugenröhrchens. Solche Zentrifugenröhrchen haben eine Länge von ca. 25 mm und einen Durchmesser von ca. 8,5 mm. Bevorzugt weist diese Röhre einen der Eintrittsöffnung zugewandten Teil auf, der für die Aufnahme der nukleinsäurehaltigen Probe ausgestaltet ist. Insbesondere ist das Volumen dieses Raumes so groß, daß die Probe vollständig aufgenommen werden kann. An der Eintrittsöffnung können zusätzlich Bauelemente vorgesehen sein, die den Verschuß der Eintrittsöffnung durch einen Deckel ermöglichen. Solche Konstruktionen sind z. B. aus Eppendorf-Hütchen bekannt.

Das Material zur Bindung der Nukleinsäuren befindet sich bevorzugt in dem Bereich der Vorrichtung, der sich in der Nähe der Austrittsöffnung befindet. Dies bedeutet, daß der Raum, welcher sich in der Röhre zwischen dem Material und der Austrittsöffnung befindet, bevorzugt kleingehalten wird, um die Gefahr des Zurückhaltens von Flüssigkeitströpfchen und somit die Kontaminationsgefahr gering zu halten. Das Material zur Bindung von Nukleinsäuren ist in der Vorrichtung fixiert. In Richtung auf die Eintrittsöffnung zu ist hierzu eine nicht ohne Zerstörung der Vorrichtung zu entfernende Haltevorrichtung vorgesehen. Sie ist bevorzugt aus demselben Material wie das Gefäß. In dieser Ausführungsform ist die Vorrichtung besonders vorteilhaft, da dann das erfindungsgemäße Gefäß inklusive Haltevorrichtung im Spritzgußverfahren herstellbar ist. Bevorzugt ragt die

Haltevorrichtung von der Innenwand des Gefäßes in den Innenraum hinein und ist in Richtung auf die Eintrittsöffnung abgeschrägt. Diese Anforderungen können beispielsweise durch einen umlaufenden Rand bzw. Vorsprung in den Innenraum gelöst werden. Die Abschrägung in Richtung auf die Eintrittsöffnung gewährleistet, daß sich in dem Innenraum nur stumpfe Winkel ergeben. Als ein wesentlicher Nachteil der bekannten Gefäße hat sich nämlich erwiesen, daß in rechten oder spitzeren Winkeln und im Fall, daß ein Ring nicht perfekt an der Innenwand des Gefäßes anliegt, Flüssigkeiten, z. B. die Probenflüssigkeit, zurückgehalten werden, und somit die Effizienz der Waschschritte verringert ist. Darüber hinaus wird bei der Herstellung dieses Gefäßes ein relativ kritischer Verfahrensschritt, nämlich das Einsetzen des Ringes, eingespart. Durch die Vorsehung der Haltevorrichtung schon bei der Herstellung des Gefäßes ist man darüber hinaus bei der Wahl der Haltevorrichtungen flexibler und kann daher das Aufeinandertreffen von Bauteilen in spitzen Winkeln vermeiden.

Die Haltevorrichtungen können jedoch auch nicht umlaufende Bauteile sein, z. B. regelmäßig oder unregelmäßig auf vergleichbarer Höhe angeordnete Vorsprünge. Materialien zur Bindung von Nukleinsäuren sind bekannt. Besonders bevorzugt als Material sind Materialien mit einer Oberfläche aus Glas. Dieses Material wird besonders bevorzugt in Form eines Vlieses eingesetzt, da Vliese sehr einfach in die Form der Innenwand der erfindungsgemäßen Vorrichtung eingepaßt werden können, ohne daß sich während der Benutzung des Materials zur Isolierung von Nukleinsäuren eine wesentliche Änderung dieser äußeren Form ergibt. Außerdem sind Vliese leicht durchströmbar für Flüssigkeiten. Als besonders bevorzugt haben sich Vliese mit einer Dichte von zwischen 40 und 100 mg/ccm (g/cdm) erwiesen.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das nukleinsäurebindende Material gegen die Austrittsöffnung hin vollflächig durch eine flüssigkeitsdurchlässige poröse Matrix abgestützt. Diese Matrix wird im folgenden auch als Stützvlies bezeichnet. Eine solche flüssigkeitsdurchlässige Matrix sind beispielsweise Vliese aus Materialien, die gegenüber den Komponenten der Flüssigkeit relativ inert sind und möglichst wenig Komponenten binden oder solche, die Nukleinsäure binden. Als besonders bevorzugt hat sich hierbei Polyester oder Polypropylen erwiesen. Diese Matrix trennt das nukleinsäurebindende Material bevorzugt praktisch vollständig (d. h. zu mehr als 90%) gegen die Austrittsöffnung ab, so daß keine Flüssigkeit von dem nukleinsäurebindenden Material direkt in die Austrittsöffnung fließen kann. Diese Matrix hat zweierlei Funktion. Zunächst dient sie zum Zurückhalten eventuell nicht fest verankerter Fasern des nukleinsäurebindenden Materials (Ausbeuteverbesserung). Darüber hinaus gibt diese Matrix die Möglichkeit, die Austrittsöffnung des Gefäßes zunächst so breit zu halten, daß das nukleinsäurebindende Material durch sie in das Gefäß eingeführt werden kann und anschließend die Austrittsöffnung verengt werden kann. Für den Fall, daß das nukleinsäurebindende Material aus einer partikulären Matrix besteht, ist dieses Material auch in Richtung auf die Eintrittsöffnung durch eine flüssigkeitsdurchlässige poröse Matrix abgestützt, um ein Aufwirbeln des Materials in den Probenaufnahmeraum zu vermeiden.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist dadurch charakterisiert, daß die Austrittsöffnung nach Einbringen des nukleinsäurebindenden Materials verengt wurde. Die Austrittsöffnung ist bevorzugt so weit verengt, daß das nukleinsäurebindende Material bzw. die stützende Matrix nicht aus der Austrittsöffnung entweichen kann. Je fester das Material bzw. die Matrix ist, desto weniger stark muß die Verengung sein. Bevorzugt ist die Verengung ein Rand, welcher sich von der Röhrchenwand umlaufend nach innen erstreckt, so daß beispielsweise bei einem Röhrchendurchmesser von 8 mm der Rand mindestens 0,5 mm, bevorzugt zwischen 0,75 und 1,5 mm von jeder Seite in den Röhrcheninnenraum hereinragt. Die untere Grenze des Hineinragens wird durch das Festhalten des Materials bzw. der Matrix limitiert, während die obere Grenze durch das möglichst vollständige Aussagen des Vlieses durch die Austrittsöffnung limitiert wird.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Gefäßes zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer flüssigen Probe mit einer Eintritts- und einer Austrittsöffnung und einem zwischen diesen Öffnungen gelegenen Material zur Bindung der Nukleinsäuren durch Einführen des Materials durch die Austrittsöffnung in Richtung auf die Eintrittsöffnung bis zu einer im Gefäß befestigten Haltevorrichtung und Verengung der Austrittsöffnung, so daß das Material zwischen Haltevorrichtung und der Verengungsstelle festgehalten wird. Die Verengung kann beispielsweise geschehen durch Umbördeln, z. B. thermisch, oder durch thermische Fixierung. Dieses Herstellverfahren ist besonders einfach und im Hinblick auf die Fixierung des Materials besonders sicher.

Das erfindungsgemäße Gefäß ist bevorzugt aus einem spritzgußfähigen Material hergestellt, z. B. Polyethylen, Polypropylen, Polycarbonat oder Polyurethan, besonders bevorzugt Polypropylen.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Materials zur Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer flüssigen Probe durch Einbringen der Probe in das erfindungsgemäße Gefäß durch eine Eintrittsöffnung, Durchtritt der Probe durch das Material und Aufhebung der Bindung der Nukleinsäuren an das Material.

In einem typischen Verfahren wird die Probe durch Pipettieren einer gewünschten Menge an Probenflüssigkeit in das Gefäß eingebracht. Danach wird der Durchtritt der Probe durch das Material veranlaßt. Dies kann beispielsweise geschehen durch Zentrifugation, wobei die Flüssigkeit durch das Material und die Austrittsöffnung aus dem Gefäß herausgeschleudert wird. Dabei werden die Nukleinsäuren an der Matrix immobilisiert, während die restliche Probenflüssigkeit austritt. Bevorzugt wird die Matrix anschließend einmal mit einem Waschpuffer mittleren Salzgehaltes gewaschen, wodurch Reste der Probenflüssigkeit und nicht zu isolierende Komponenten aus dem Material entfernt werden.

Danach können die an der Matrix immobilisierten Nukleinsäuren durch einen Nidrigsalzpuffer von der Matrix eluiert werden. Solche Puffer sind aus DE 37 24 442 (Ansorge) und Analytical Biochem. 175, 196—201 (1988) bekannt. Bevorzugt wird ein Puffer mit niedrigem Salzgehalt, kleiner 200 mM NaCl verwendet, z. B. 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 oder H₂O. Für die erfindungsgemäße Matrix ergeben sich relativ hohe Ausbeuten.

In Fig. 1 ist ein besonders geeignetes erfindungsgemäßes Gefäß im Querschnitt gezeigt.

Das gezeigte erfindungsgemäße Gefäß besteht aus einem im wesentlichen zylindrischen Teil 1, der an einem Ende eine Eintrittsöffnung 2 aufweist, die mit einem Deckel 3 verschlossen werden kann. In Richtung auf die Austrittsöffnung 4 findet man die Haltevorrichtungen 5, deren Abschrägungen 6 klar erkenntlich sind. Die Haltevorrichtungen sind in der bevorzugten Ausführungsform ein umlaufender Rand aus demselben Material wie der zylindrische Körper 1. An die Haltevorrichtungen schließt sich das nukleinsäurebindende Material 7 an. Gegenüber der Austrittsöffnung 4 ist das Material durch ein Stützvlies 8 abgegrenzt. Das Stützvlies wird durch den Rand 9 innerhalb des Gefäßes festgehalten.

In Fig. 2 ist ein Röhrchen vor Bestückung mit dem nukleinsäurebindenden Material gezeigt.

In Fig. 3A und 3B ist die Bestückung des Röhrchens mit dem nukleinsäurebindenden Material 7 und einem Stützvlies 8 gezeigt.

In Fig. 4 ist das fertige erfindungsgemäße Röhrchen gezeigt.

In Fig. 5 ist ein Röhrchen gezeigt, dessen Bördelkante Schlitz aufweist, (Längsschnitt, Maße in mm).

In Fig. 6 ist das Röhrchen von Fig. 5 von unten gezeigt.

In Fig. 7 ist das Röhrchen von Fig. 5 analog Fig. 3A im Zustand vor Umbördelung des Rands gezeigt. Die Schlitz sind gestrichelt gezeichnet.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert:

Beispiel 1

Herstellung eines erfindungsgemäßen Zentrifugationsröhrchens

Im Spritzgußverfahren wird der Grundkörper 1 eines in Fig. 2 im Längsschnitt dargestellten Zentrifugationsröhrchens, welches eine Länge von ca. 25 mm und einen Durchmesser von ca. 8,5 mm hat, aus Polypropylen PPN 1060 natur hergestellt. In der Spritzgußmaschine werden je ein Glasfaservlies (WF 264 Whatman, Flächengewicht 60 g/m²) 7 und ein Stützvlies 8 zugeführt und ausgestanzt. Je nach gewünschter Bindekapazität werden mehrere Glasvliese 7 eingesetzt, z. B. 7 Stück. Die ausgestanzten Vliese werden in das Zentrifugationsröhrchen wie in Fig. 3A und 3B dargestellt von der Seite der Austrittsöffnung eingebracht. Danach wird die Austrittsöffnung 4 durch Umformen des noch etwa 60°C warmen Kunststoffs mit einem Stempel soweit verengt, daß die beiden Vliese wie in Fig. 4 dargestellt fest fixiert sind.

Beispiel 2

Isolierung von Plasmid DNA aus E. coli Kulturen

Anzucht von E. coli x pUC19: 25 ml LB-Medium + Ampicillin (150 µg/ml) wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln bebrütet. Die OD₆₀₀-Messung ergab einen Wert von 2,0 (entspricht ca. 2×10^9 Zellen/ml). Es wurden verschiedene E. coli Stämme verwendet.

Isolierung der Plasmid DNA: 1,5 ml der Bakterienkultur werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für ca. 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf-Tischzentrifuge Typ 5415C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, das Sediment wird in 250 µl Puffer I (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 mg/ml RNase A, pH 8,0) vollständig resuspendiert und vorsichtig mit 250 µl Puffer II (0,2 M NaOH, 1% Natrium-dodecylsulfat) versetzt. Die Zellen lysieren vollständig und ergeben eine klare Lösung. Der Ansatz wird mit 350 µl Puffer III (2,9 M Guanidinium-HCl, 0,65 M K-Acetate, pH 4,15) gemischt und für ca. 3 min auf Eis inkubiert. Es bildet sich ein weißes Präzipitat, das durch Zentrifugation sedimentiert wird, ein Filtertube wird in ein Auffanggefäß gesteckt und der Überstand wird auf das Filtertube aufgetragen. Durch kurze Zentrifugation wird die Flüssigkeit durch das Glasvlies transferiert. Der Durchlauf wird verworfen und es werden 500 µl Waschpuffer I (5 M Guanidinium-HCl, 20 mM Tris, 37% Ethanol, pH 6,65) aufgetragen und zentrifugiert. Die Verwendung von Waschpuffer I ist optional für besonders nuclease-reiche E. coli Stämme. Anschließend werden 500 µl Waschpuffer II (20 mM NaCl, 2 mM Tris, 80% Ethanol, pH 7,5) auf das Filtertube aufgetragen und wie vor zentrifugiert. Das Filtertube wird nun in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid DNA in 100 µl TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,5) eluiert.

Tabelle 1 gibt die Ausbeute und Reinheit der Isolierten Plasmid DNA wieder:

Tabelle 1

Ausbeute und Reinheit von isolierter Plasmid DNA aus verschiedenen E. coli Stämmen

Stamm	Waschpuffer I	Waschpuffer II	Ausbeute [μ g]	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
XL 1 blue	ja	ja	8,9	1,8
XL 1 blue	nein	ja	9,4	1,82
DH5 α	ja	ja	4,2	1,52
DH5 α	nein	ja	4,2	1,62
HB101	ja	ja	4,7	1,7
HB101	nein	ja	5,8	1,77

Beispiel 3

Reinigung von Reaktionsprodukten der Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Abtrennverhalten des Filtrertubes: 10 μ g Molekulargewichtsstandard VIII (Boehringer Mannheim, Fragmentlängen [bp]: 1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67, 37, 34, 26, 19) in 100 μ l TE, werden mit Rinderserumalbumin (20 mg/ml) versetzt. Zu dieser Mischung werden 500 μ l NA-Bindungspuffer (3 M Guanidinium-Thiocyanat, 10 mM Tris-HCl, 5% Ethanol (v/v), pH 6,6, 25°C) gegeben und sorgfältig gemischt. Die Lösung wird auf ein Filtrertube aufgetragen und ca. 30 Sekunden in einer Eppendorf Tischzentrifuge Typ 5415C zentrifugiert. Der Durchlauf wird aufgefangen, er kann für spätere Analysen aufbewahrt werden. Das Vlies wird mit 500 μ l Waschpuffer II gewaschen anschließend durch kurze Zentrifugation getrocknet. Die gebundene Nucleinsäure wird mit 50 μ l TE eluiert.

Gelelektrophorese und Silberfärbung: Zur Überprüfung der Abtrennung des Modellproteins RSA und kleiner DNA Fragmente wird eine Polyacrylamid Gelelektrophorese mit dem Phastsystem (Pharmacia) durchgeführt.

4 μ l des Eluates wird mit 1 μ l 5 \times Proben-Puffer versetzt. Als Kontrolle werden 4 μ l Längenstandard VIII sowie 4 μ l einer 1 : 100 Verdünnung der RSA Lösung in TE-Puffer ebenfalls mit 1 μ l 5 \times Proben-Puffer versetzt.

Die Proben werden kurz in der Eppendorf-Zentrifuge anzentrifugiert und 3 μ l der Proben werden auf einen 6/4 Kamm (Pharmacia) aufgetragen und in einem Phast Gel, Gradient 8–25% (Pharmacia) unter Verwendung von Native Buffer Strips (Pharmacia) aufgetrennt.

Anschließend werden die Proben in der Phast System Development Unit (Pharmacia) durch Silberfärbung detektiert.

Auswertung: Die einzelnen DNA Fragmente aus dem Eluat sind entsprechend der Kontrolle Längenstandard VIII aufgetrennt. Die Fragmente < 100 bp im Eluat sind durch die Reinigung mit dem Filtrertube abgetrennt worden. Außerdem ist keine Proteinbande entsprechend der RSA Kontrollspur sichtbar.

Phast Gel Separation Programm

1)	Vorlauf	400 V	10 mA	2,5 W	15°C	100 Vh
2)	Auftrag	400 V	1 mA	2,5 W	15°C	5 Vh
3)	Trennung	400 V	10 mA	2,5 W	15°C	45 Vh

Gele nach Auftrennung für 5 Minuten in 25% Trichloressigsäure-Lösung inkubieren.

Phast Gel Development Programm

1)	Glutaraldehyd, 5 %	5	Minuten	50°C
2)	H ₂ O	2	Minuten	50°C
3)	H ₂ O	2	Minuten	50°C
4)	AgNO ₃ , 0,4 %	10	Minuten	40°C
5)	H ₂ O	0,5	Minuten	30°C
6)	H ₂ O	2,5	Minuten	30°C
7)	NaHCO ₃ / Formaldehyd	0,5	Minuten	30°C
8)	NaHCO ₃ / Formaldehyd	4	Minuten	30°C
9)	Ethanol, 10 % / Essigsäure, 5 %	2	Minuten	50°C
10)	Glycerin, 5 % / Essigsäure, 10 %	3	Minuten	50°C

Reinigung von PCR Reaktionsprodukten: DNA des Phagen Lambda wird als Matrize für die Herstellung von PCR Produkten folgender Länge verwendet: 500 bp, 750 bp, 1500 bp, 3000 bp. Folgende PCR-Ansätze werden zusammen pipettiert, gemischt und in einem Thermocycler Perkin-Elmer Typ 9600 inkubiert.

Länge PCR Produkt [bp]	500	750	1500	3000
H ₂ O	372,5 µl	372,5 µl	372,5 µl	372,5 µl
dNTP [10 mM]	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl
λ-DNA [1 ng/µl]	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
10 x Reaktionspuffer	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Primer 1	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Primer 2	5 µl			
Primer 3		5 µl		
Primer 5			5 µl	
Primer 7				5 µl
Primer 10				
Taq-Polymerase [U]	2,5	2,5	2,5	2,5

Alle Reagenzien aus Boehringer Mannheim PCR Core Kit (Kat. No. 1 578 553)

Thermocycler-Programm für 500, 750 und 1500 bp:

2 Min	94°C
10 Cyclen:	
10 Sek.	94°C
30 Sek.	55°C
1 Min	72°C
20 Cyclen:	
10 Sek.	94°C
30 Sek.	55°C
1 Min	72°C + 20 Sek./Zyklus

7 Min 72°C

3000 bp:

2 Min	94°C
10 Cyclen:	
10 Sek.	94°C
30 Sek.	55°C
5 Min	72°C
20 Cyclen:	
10 Sek.	94°C
30 Sek.	55°C
5 Min	72°C
	+ 20 Sek./Zyklus

7 Min 72°C

Die PCR-Produkte wurden wie oben beschrieben gereinigt und im Phastgelsystem analysiert. Parallel wurde jeweils ein Aliquot des Reaktionsproduktes vor der Reinigung analysiert.

Auswertung: Im Vergleich vor der Reinigung sind bei allen PCR-Produkten überschüssige Primer abgetrennt worden. Es konnten zwischen 1,4 und 4 µg PCR Produkt isoliert werden.

Klonierung von PCR-Produkten

pUCIQ17 (3632 bp, Boehringer Mannheim) wurde mit dem Restriktionsenzym DraII linearisiert und in folgendem PCR-Ansatz amplifiziert:

PCR Ansatz:

pUCIQ17	10 ng
Primer 1	2 µM
Primer 2	2 µM
10 x Puffer	50 µl
dNTP	0,2 mM
Taq Polymerase	2,5 U
H ₂ O	ad 500 µl

PCR Programm (PE 9600):

18 Cyclen:	
10 Sek.	94°C
30 Sek.	57°C
4 Min	72°C

Alle Reagenzien aus Boehringer Mannheim PCR Core Kit.

Die Primer binden bei Nukleotid 3500 und 3632 und ergeben ein 3493 bp PCR-Produkt. Sie enthalten eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym ClaI, diese Schnittstelle kommt im Plasmid pUCIQ17 nicht vor.

Primer 1: 5'-AGCTTATCGATGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCG-3'

Primer 2: 5'-AGCTTATCGATAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGC-33'

Im Anschluß an die PCR-Reaktion wurde das Reaktionsprodukt nach der oben beschriebenen Methode gereinigt. Zum Vergleich wurde eine Reinigung durch Präzipitation mit Polyethylenglycol-Fällung (PEG) durchgeführt [Barnes W. M. (1992) Gene 112, 29]. Hierdurch werden störende Komponenten für die nachfolgende Religations-Reaktion entfernt. Beide Proben werden mit dem Restriktionsenzym ClaI gespalten und über ein Agarosegel aufgetrennt. Die DNA Fragmente werden aus dem Agarosegel eluiert. Die hier verwendeten Methoden sind Standardverfahren und etwa beschrieben in Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Die Proben (max. 30 ng) werden unter Verwendung des Rapid DNA Ligation Kit (Boehringer Mannheim, Kat. Nr. 1 635 379) nach Kit Vorschrift religiert und in kompetente E. coli DH5α Zellen transformiert. Die Zellen werden auf TN Ap 100 X-Gal Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Kolonien ausgezählt, das Ergebnis ist in Tabelle 2 dargestellt.

Reinigung	Filtertube	PEG
Zahl der Kolonien	2212	2832

Die Anzahl der Kolonien ist bei Reinigung über Filtertube in der gleichen Größenordnung wie bei Reinigung über PEG. Die wesentlich einfachere Filtertube Methode liefert daher eine ähnlich saubere Nukleinsäure wie die wesentlich zeitaufwendigere PEG-Methode.

Beispiel 4

Ausführungsform mit geschlitztem Bördelrand und kleinerer Austrittsöffnung

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Zentrifugationsröhrchens ist die Austrittsöffnung wie in Fig. 5 dargestellt stärker verengt. In dieser Ausführungsform ist der Bördelrand der Auslaßöffnung (wie in Fig. 6 dargestellt) geschlitzt. Mit dieser Anordnung ist es möglich, besonders hochviskose Lösungen zu zentrifugieren, ohne daß eine größere Menge an Restflüssigkeit im Device nach der Zentrifugation zurückbleibt.

Beispiel 5

Durch die gewählte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Zentrifugationsdevice in Beispiel 1 und Beispiel 4, wird vermieden, daß nach der Zentrifugation Flüssigkeit in toten Winkeln des Device zurückbleibt. Nicht vollständige Zentrifugation führt zu Ausbeuteverlusten, und zu geringerer Reinheit der isolierten Nukleinsäure.

Restflüssigkeit nach Einfüllen von 500 µl Wasser und anschließende Zentrifugation für 2 Minuten bei 6000 × g

						MW.
Zentrifugationsröhrchen gem. Beispiel 1	1,7mg	1,6mg	1,6mg	1,4mg	1,8mg	1,6mg
QIA Quick Device	9,5mg	9,9mg	9,9mg	10,2mg	10,5mg	10,0mg
Zentrifugationsröhrchen gem. Beispiel 4	1,7mg	2,0mg	1,5mg	2,3mg	2,1mg	1,9mg

MW: Mittelwert

Es wird klar, daß die erfindungsgemäßen Röhrchen erheblich weniger Restflüssigkeit zurückhalten. Dies ist wohl insbesondere auf die Abschrägung an der Haltevorrichtung zurückzuführen.

Patentansprüche

- Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer flüssigen Probe mit einer Eintritts- und einer Austrittsöffnung und einem zwischen diesen Öffnungen gelegenen Material zur Bindung der Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß die Austrittsöffnung nach Einbringen des Materials verengt wurde.
- Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Material in Richtung der Eintrittsöffnung durch eine nicht ohne Zerstörung der Vorrichtung zu entfernende Haltevorrichtung festgehalten ist.
- Vorrichtung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Haltevorrichtung einstückig aus demselben Material wie die Vorrichtung besteht.
- Vorrichtung gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Haltevorrichtung von Innenwand des Gefäßes in den Innenraum hineinragt und in Richtung auf die Eintrittsöffnung abgeschrägt ist.
- Vorrichtung gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Material gegen die Austrittsöffnung hin vollflächig durch eine flüssigkeitsdurchlässige poröse Matrix abgestützt ist.
- Verfahren zur Herstellung einer Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer flüssigen Probe mit einer Eintritts- und einer Austrittsöffnung und einem zwischen diesen Öffnungen gelegenen Material zur Bindung der Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß es folgende Schritte enthält:
 - Einführen des Materials durch die Austrittsöffnung in Richtung auf die Eintrittsöffnung bis zu einer im Innenraum der Vorrichtung befestigten Haltevorrichtung und
 - Verengung der Austrittsöffnung, so daß das Material zwischen Haltevorrichtung und der Ver-

gungsstelle festgehalten wird.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Verengung der Austrittsöffnung durch Umbördeln oder thermische Fixierung vorgenommen wird.

8. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer flüssigen Probe durch

- Einbringen der Probe in eine Vorrichtung gemäß Anspruch 1 durch die Eintrittsöffnung,
- Durchtritt der Probe durch das Material und
- Aufhebung der Bindung der Nukleinsäuren an das Material.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

FIG 1

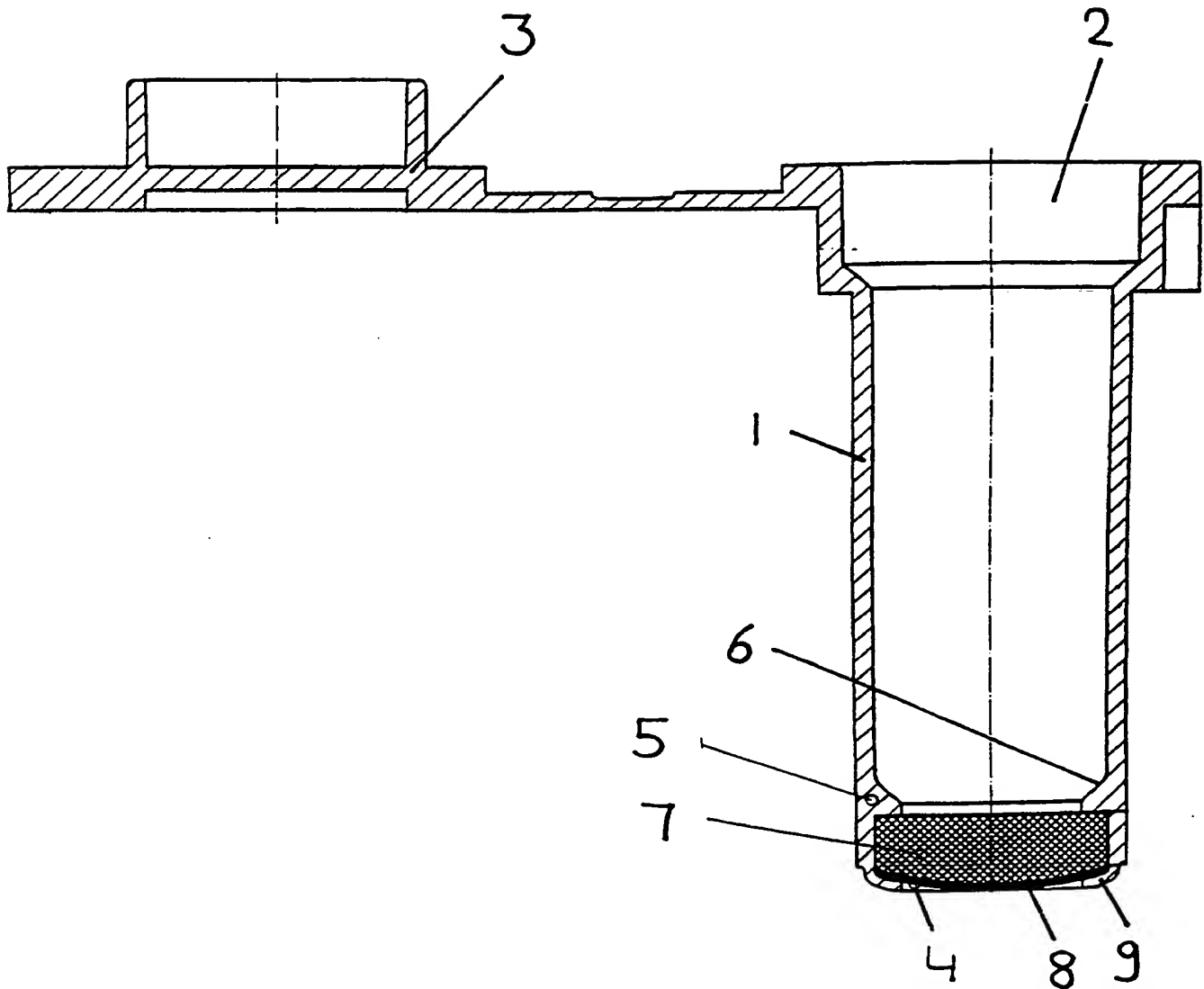


FIG 2

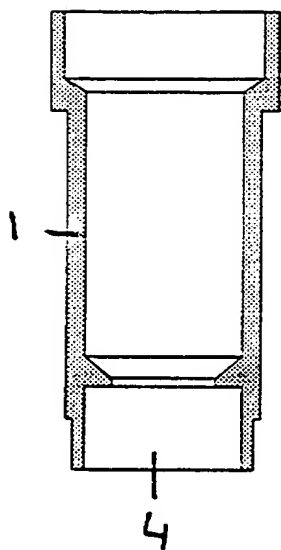


FIG 3A

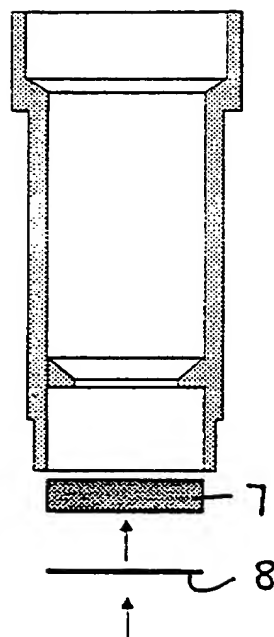


FIG 3B

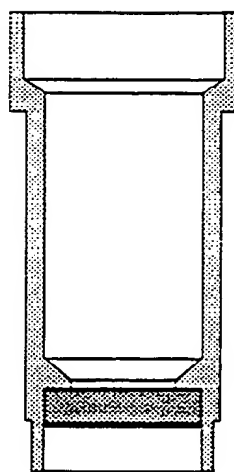


FIG 4

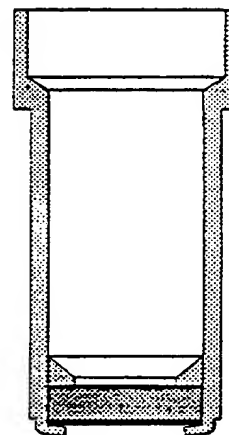


FIG 5

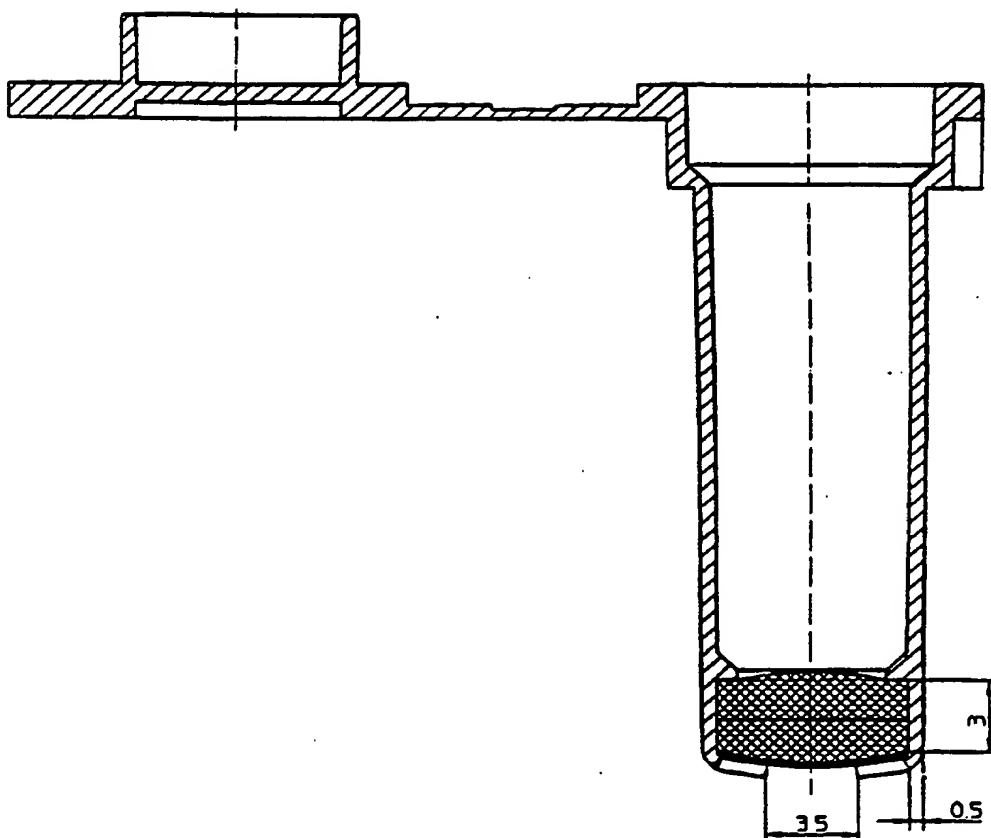


FIG 6

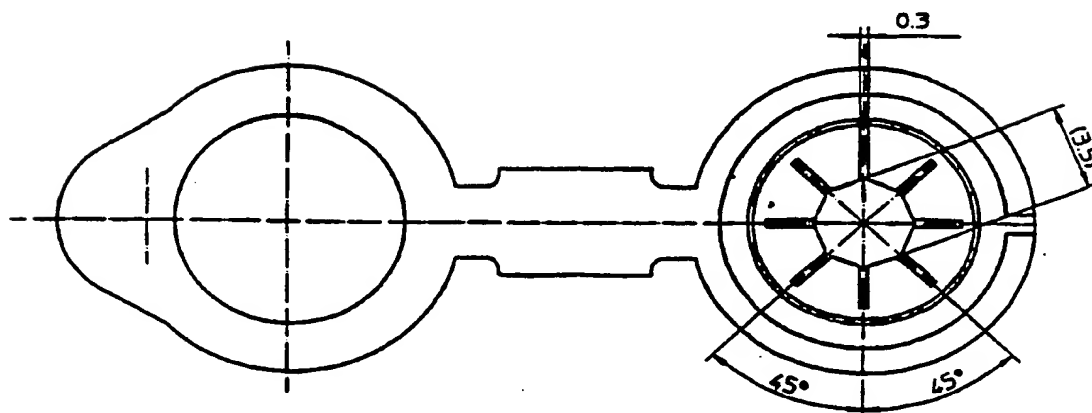
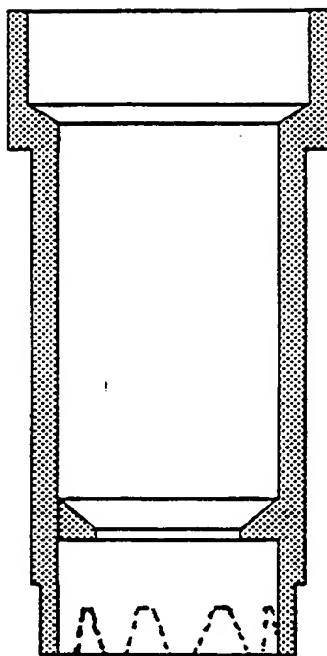


FIG 7



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)